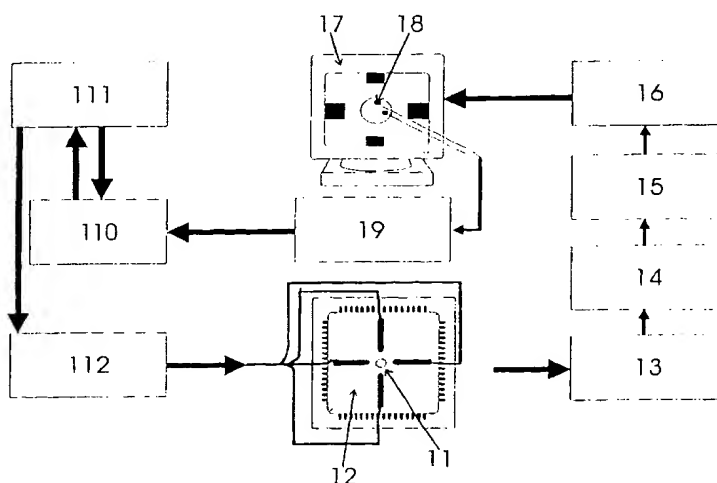


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 15/14, C12M 1/34, G01P 3/80</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/29732 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Juli 1998 (09.07.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/07218 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Dezember 1997 (19.12.97) (30) Prioritätsdaten: 197 00 004.5 1. Januar 1997 (01.01.97) DE 197 23 873.4 6. Juni 1997 (06.06.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC BIOSYSTEMS GMBH [DE/DE]; Grandweg 64, D-22529 Hamburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FUHR, Günter [DE/DE]; Berliner Strasse 28A, D-13127 Berlin (DE). SCHNELLE, Thomas [DE/DE]; Koppenstrasse 65, D-10243 Berlin (DE). GLASSER, Henning [DE/DE]; Boxhagener Strasse 38, D-10245 Berlin (DE). (74) Anwalt: HERTZ, Oliver; von Bezold, Dieter, Schlitz, Peter, Heusler, Wolfgang, Hertz, Oliver, Briener Strasse 52, D-80333 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETECTING THE MOVEMENT OF MICROSCOPIC OBJECTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR BEWEGUNGSERFASSUNG AN MIKROSKOPISCHEN OBJEKTEN



(57) Abstract

The invention relates to a method for detecting the periodic movement of a microscopic object by producing an enlarged image of the object and detecting a partial area of the object with a detecting means. Said detecting means produces a detection signal, the time dependence of which is characteristic of the time dependence of the movement of the object. The detection signal is digitalized and subjected to a Fourier and/or correlation analysis.

(57) Zusammenfassung

Die periodische Bewegung eines mikroskopisch kleinen Objekts wird erfaßt, indem eine vergrößerte Abbildung des Objekts erzeugt und mit einem Detektormittel ein Teilbereich des Objekts erfaßt wird. Das Detektormittel stellt ein Detektorsignal bereit, dessen Zeitabhängigkeit charakteristisch für die Zeitabhängigkeit der Objektbewegung ist. Das Detektorsignal wird digitalisiert und einer Fourier- und/oder Korrelations-Analyse unterzogen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Vorrichtung zur Bewegungserfassung
an mikroskopischen Objekten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur automatischen Bewegungserfassung an mikroskopisch kleinen Teilchen, insbesondere zur Messung der Geschwindigkeit von Rotationen oder zumindest teilweise periodischen transversalen Bewegungen derartiger Teilchen, wie z.B. zur Messung von Rotations- und Oszillationsbewegungen biologischer Zellen oder biologischer Zellbestandteile in wässrigen Suspensionen.

Zur Charakterisierung von Mikroobjekten (wie z.B. Latexpartikel, lebende Zellen usw.), die in Flüssigkeit suspendiert sind, werden charakteristische Objektbewegungen verwendet, die über elektrische Rotations- und Wechselfelder induziert werden (Übersicht in U. Zimmermann et al. "Electro-manipulation of Cells" CRC Press Inc., 1996). Die Objektbewegung kann beispielsweise eine Rotation oder eine Oszillation auf einer geradlinigen oder gekrümmten Bewegungsbahn sein. Aus den Bewegungseigenschaften (z.B. Geschwindigkeit, Auslenkung aus einer Gleichgewichtslage) kann auf passive elektrische Eigenschaften der bewegten Objekte geschlossen werden. Charakteristische Oszillationsgeschwindigkeiten der Objekte liegen im Bereich von 100 Umdrehungen (oder Schwingungen) pro Sekunde bis zu 1 Umdrehung (oder Schwingung) pro Minute, typischerweise unterhalb von 1 Umdrehung oder Schwingung pro Sekunde.

Die Objektrotation verhält sich proportional zum Imaginärteil des Clausius-Mosotti-Faktors, während die oszillatorische Bewegung in einem inhomogenen Wechselfeld dem Realteil dieses

Faktors entspricht (s. T.B. Johns "Elektromechanics of Particles", Cambridge University Press, Cambridge, 1995).

Die Erfassung passiver elektrischer Eigenschaften biologischer Objekte hat sich in der Biologie und Medizin als hochauflösendes Untersuchungsverfahren erwiesen, das mit Impedanzmessungen vergleichbar ist. Nachteilig ist jedoch, daß die Rotation oder transversale Bewegung eines Objektes bislang entweder durch visuelle Beobachtung oder durch aufwendige technische Verfahren bestimmt werden muß. Ferner ist es bislang unmöglich, sowohl den Imaginär- als auch den Realteil des Clausius-Mosotti-Faktors an einzelnen Mikroobjekten automatisch zu erfassen. Dies wäre jedoch insbesondere bei kompliziert aufgebauten Objekten von Bedeutung, da die Real- und Imaginär-Teile mit der Kramers-Kronig-Beziehung ineinander überführbar sind, so daß eine Kontrolle der Meßwerte bzw. der verwendeten Modelle möglich wäre. Ein weiterer Nachteil ist, daß mit der direkten (visuellen) Beobachtung nur relativ langsame Bewegungen genügend genau meßbar sind (langsamer als 1 Umdrehung pro Sekunde).

Automatische Rotationsmessungen sind z. B. aus DE-OS 33 25 843 oder DD-WP 281 223 (1986) bekannt. Bei dieser Messung werden elektrische Wechselfelder zur Induzierung unterschiedlicher Drehrichtungen appliziert. Die Anschaltzeiten werden so lange variiert, bis das Objekt still steht. Diese Methode ist wegen des Steuer- und Zeitaufwandes und wegen der Notwendigkeit nachteilig, daß der Objektstillstand durch visuelle Beobachtung bestimmt werden mußte.

Es ist ferner allgemein bekannt, die Bewegung komplex strukturierter Objekte mit Bildverarbeitungssystemen zu erfassen. Mikroskopische Objektbilder werden in zeitlicher Folge aufgenommen, gespeichert und über eine Raum-Transformation einer Vielzahl von Bildpunkten zur Bewegungskonstruktion bearbeitet. Dies ist nachteilig, da eine hohe Informationsdichte zu verarbeiten ist, was die Rechnerverarbeitung lang-

wierig und aufwendig gestaltet. Zusätzliche Probleme treten bei Veränderungen der Objektstruktur während der Messung auf, falls sich z.B. die Fokusebene verlagert oder falls die Objekte einen schwachen Kontrast besitzen.

Von J. Gimsa et al. ("Electro-rotation of Particles by Dynamic Light Scattering - A new dielectric spectroscopy technique", Colloids and Surfaces A: Band 98, S. 423 ff., 1995) wird eine automatische Bewegungsmessung unter Verwendung der dynamischen Lichtstreuung beschrieben. Dieses Verfahren ist jedoch in seiner Anwendbarkeit beschränkt, da es nicht an einzelnen Objekten einsetzbar ist, sondern lediglich Mittelwerte über eine Vielzahl von Partikeln liefert, die sich in einem Meßstrahl befinden. In der Regel handelt es sich dabei mindestens um 100 Partikel.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Bewegungserfassung an mikroskopisch kleinen Objekten anzugeben, mit dem insbesondere eine schnelle und automatisierbare Bewegungsmessung selbst an einzelnen Teilchen ermöglicht wird und das einen erweiterten Anwendungsbereich besitzt. Mit dem Verfahren sollen beliebige periodische Bewegungen, insbesondere sowohl Rotations- als auch Oszillationsbewegungen erfaßt werden. Aufgabe der Erfindung ist es ferner, eine Vorrichtung zur Implementierung des Verfahrens anzugeben.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Verfahren und eine Vorrichtung mit den Merkmalen entsprechen den Patentansprüchen 1 bzw. 12 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Erfindung beruht auf der Idee, mit mindestens einem Detektormittel eine Abbildung des zu untersuchenden, bewegten Objekts zu erfassen, ein Detektorsignal des Detektormittels über mehrere Objektdrehungen oder -oszillationen aufzunehmen und einer Fourier- und/oder Korrelations-Analyse zu unterziehen. Mit dem Detektormittel wird vorzugsweise ein Teil des Objekt-

bildes erfaßt. Die Fourier- und Korrelations-Analyse erfolgt nach an sich bekannten, herkömmlichen Algorithmen und wird daher hier im einzelnen nicht beschrieben. Die Analyse liefert die Frequenz der Objektrotation oder -oszillation und ganzzahlige Vielfache von dieser. Aus der Amplitude und Frequenz der Analysensignale kann auf die tatsächliche Partikelbewegung rückgeschlossen werden.

Werden zwei oder mehrere Detektormittel zur Teilbilderfassung verwendet, so kann aus der Phasenverschiebung der Korrelations-signale die Bewegungsrichtung (der Rotation oder Translation) erfaßt werden. Der Einsatz mehrerer Detektormittel ist jedoch nicht zwingend erforderlich. Vielmehr ist es auch möglich, die Objektbewegung mit einem einzelnen Detektormittel zu erfassen.

Eine erfindungsgemäße Vorrichtung umfaßt Abbildungsmittel zur Erzeugung eines vergrößerten Objektbildes, mindestens ein Detektormittel, das dazu eingerichtet ist, einen Teilbereich des Objektbildes zu erfassen, und Signalbearbeitungs- und Rechenmittel. Die Abbildungsmittel sind vorzugsweise in den Strahlengang eines Mikroskops integriert oder werden durch ein mit einem Mikroskop gekoppeltes Anzeigemittel gebildet.

Die erfindungsgemäße Bewegungserfassung besitzt den Vorteil, daß eine relativ geringe Anzahl serieller Meßwerte erfaßt, gespeichert und verarbeitet wird. Eine Muster- oder Bilderkennung ist nicht erforderlich, so daß die zu verarbeitende Informationsdichte stark reduziert ist. Aufgrund der geringen Datenmengen lassen sich die Fourier- und Korrelations-Analysen schnell und mit hoher Genauigkeit ausführen. Die Objektbewegung kann in Echtzeit erfaßt werden. Mit der Erfindung können die bisherigen Beobachtungsgrenzen überwunden werden. So ist erfindungsgemäß die Erfassung von bisher nicht auflösbaren Partikelbewegungen mit Frequenzen unterhalb von 2 Schwingungen pro Sekunde erfaßbar.

Die erfindungsgemäße Bewegungserfassung ist leicht automatisierbar. Es lassen sich ohne weiteres einzelne Objekte oder simultan eine Vielzahl von Objekten beobachten.

Eine bevorzugte Verwendung der Erfindung ist die Ermittlung passiver elektrischer Eigenschaften biologischer Objekte, die in einem Feldkäfig mittels negativer Dielektrophorese angeordnet und durch Anlegen rotierender elektrischer oder sich periodisch ändernder Wechselfelder in einem schwebenden Zustand in die jeweilige Bewegung versetzt werden.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß die Erfassung der Bewegung mikroskopisch vergrößerter Partikel ermöglicht wird, die im Unterschied etwa zur Erfassung der Bewegung makroskopischer Werkstücke wesentlich empfindlicher auf Umgebungsstörungen (thermische Bewegung, Lösungsmittelströmungen) reagieren können als ein eingespanntes Werkstück. Mit der Erfindung wird erstmalig die Anwendung von Fourier-Analyse- oder Korrelations-Techniken an Mikroobjekten realisiert.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden im folgenden in Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1: eine Blockdarstellung einer Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Meßanordnung;

Fig. 2: Beispiele mikroskopischer Abbildungen von biologischen Zellen;

Fig. 3: Kurvendarstellungen der Signalverläufe bei der erfindungsgemäßen Erfassung der Rotation eines synthetischen Objekts;

Fig. 4: Kurvendarstellungen der Signalverläufe bei der erfindungsgemäßen Erfassung der Rotation eines Lymphozyten;

Fig. 5: Kurvendarstellung der Signalverläufe bei der erfindungsgemäßen Erfassung der Rotation eines Pollenkornes;

Fig. 6: eine Kurvendarstellung zur Illustration von Vorteilen der erfindungsgemäßen Bewegungserfassung; und

Fig. 7: weitere Kurvendarstellungen der Signalverläufe bei der erfindungsgemäßen Erfassung der Rotation eines synthetischen Objekts.

Im folgenden wird die Erfindung am Beispiel der Rotationsmessung an synthetischen oder biologischen Objekten, die mit einer Mikroelektrodenanordnung manipuliert und mit einem Lichtmikroskop beobachtet werden, beispielhaft beschrieben. Die Erfindung ist jedoch in gleicher Weise bei der Erfassung von periodischen Translationsbewegungen auf geraden oder gekrümmten Teilchenbahnen oder von periodischen Schwenkbewegungen (Drehung mit Richtungsumkehr) einsetzbar. Außerdem ist die Realisierung der Erfindung nicht an die Kombination mit Mikroelektrodenanordnungen und Mikroskopbeobachtungen gebunden, sondern allgemein bei der Bewegungserfassung beliebiger Objekte anwendbar.

Eine erfindungsgemäße Vorrichtung enthält entsprechend der schematischen Übersicht gemäß Fig. 1 eine Elektrodenanordnung 12 zur Bildung eines Mikrofeldkäfigs, in dem ein mikroskopisch kleines Objekt 11 (Größe ungefähr 500 μm oder geringer) in eine periodische Bewegung (Rotation oder transversale Oszillation) versetzt wird. Die Abbildungsmittel umfassen beim dargestellten Beispiel ein Lichtmikroskop 13 mit einer elektronischen Bilderfassung (Videokamera 14), gegebenenfalls einem simultan betriebenen Videorecorder 15, einem Videosignal-

konverter 16 und einem Anzeigemittel (z.B. Bildschirm oder Monitor 17). Mit dieser Anordnung ist ein Abbild des beobachteten Objekts 11 (z.B. biologische Zelle, synthetischer Partikel) zum Beispiel in Auflicht- oder Durchlichtdarstellung auf dem Monitor 17 darstellbar. Der Videosignalkonverter 16 kann eine Schaltungsanordnung zur Bildbearbeitung, zum Beispiel für eine Falschfarbendarstellung oder eine Kontrasterhöhung enthalten.

Die Abbildungsmittel (13-17) können ersatzweise durch eine Anordnung zur vergrößerten Abbildung des Objekts auf einen Bereich gebildet werden, in dem sich das oder die Detektormittel befinden. Das Objekt kann beispielsweise mit einer geeigneten Optik ganz oder teilweise direkt auf das Detektormittel (z.B. eine CCD-Matrix oder Zelle) abgebildet werden. Es ist auch möglich, einen CCD-Detektor im Strahlengang eines Mikroskops anzuordnen und einen Teil des mikroskopischen Bildes auf den Detektor zu projizieren.

Zur Realisierung der Erfindung ist es erforderlich, daß das Detektormittel zur Aufnahme eines Lichtsignals eingerichtet ist, das sich entsprechend der periodischen Objektbewegung verändert. Wegen der in der Regel integrierenden Wirkung von Photodetektoren wird daher vorzugsweise nicht das Gesamtbild des Objektes, sondern nur ein Teilbereich von diesem aufgenommen. Der Teilbereich ist vorzugsweise wesentlich kleiner als 50% der abgebildeten Objektfläche. Es ist jedoch in speziellen Fällen auch möglich, das Gesamtbild des Objektes zu erfassen, falls sich dieses mit der periodischen Bewegung selbst periodisch ändert. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn bei einer translatorischen Oszillation nur ein Teil der Bewegungsbahn beleuchtet oder bei besonderen Objektformen und geeigneter Beleuchtungsrichtung während der Rotation eine periodische Reflektivitätsänderung des Objekts stattfindet.

Um die allgemein am breitesten anwendbare und bevorzugte Ausführungsform der Aufnahme nur eines Teilbereiches des bewegten Objektes mit Detektormitteln zu realisieren, wird das Maß der Bildvergrößerung an die Größe des beobachteten Objektes und die Größe der lichtempfindlichen Fläche des Detektormittels angepaßt. Daher muß der Abbildungsmaßstab nicht unbedingt ein visuell gut beobachtbares Abbild ergeben. Dies ist insbesondere zur Implementierung der Erfindung in automatisierten Systemen von Bedeutung.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung enthält gemäß Fig. 1 ferner Detektormittel zur Aufnahme eines Teilbereiches des abgebildeten Objekts. Das Detektormittel umfaßt mindestens ein Photoelement 18 (Photowiderstand, Photodiode, Phototransistor, CCD-Detektor oder ähnliches), das unmittelbar auf der Bildschirmfläche des Monitors 17 angebracht ist. Das oder die Photoelemente werden einfach auf dem Bildschirm mit geeigneten Haftmitteln befestigt. Es ist möglich, nur ein Photoelement zur Erfassung eines Teilbereiches des beobachteten Objekts anzubringen. Alternativ ist es möglich, mit Abstand von dem ersten Photoelement ein zweites Photoelement zur Erfassung eines Teilbereiches des Objekts anzubringen, um eine Information über die Bewegungsrichtung des Objektes zu erhalten (s. unten). Schließlich ist es zur Erhöhung des Signal-Rausch-Abstandes möglich, zusätzlich ein weiteres Photoelement zur Aufnahme des Bildhintergrundes vorzusehen, wodurch das Hintergrundrauschen bei der Signalverarbeitung berücksichtigt werden kann.

Das Signal des Detektormittels wird mit einem Signalkonverter 19 entsprechend einer Meßfrequenz digitalisiert und über eine Schnittstelle 110 einem Steuerrechner 111 zugeführt. Der Steuerrechner 111 ist insbesondere zur Realisierung der Standardprozeduren der Bildung der Fourier-Transformierten und/oder der Autokorrelationsfunktion eingerichtet.

Um die passiven elektrischen Eigenschaften biologischer Objekte durch Aufnahme vollständiger Bewegungsspektren (z.B. Bewegungsresponse des Objektes in Abhängigkeit von der Frequenz rotierender elektrischer Felder im Mikrofeldkäfig) zu erfassen, ist es gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung zweckmäßig, den Steuerrechner 111 mit einem Hochfrequenz-generator 112 zu verbinden. Die Generatorausgangssignale des Hochfrequenzgenerators 112 sind zur Ansteuerung der Elektroden der Mikroelektrodenanordnung 12 vorgesehen. Zur Gewinnung vollständiger Spektren wird die Frequenz, Amplitude und/oder Phasenlage der Generatorausgangssignale durch den Steuerrechner 111 in Abhängigkeit von den erfaßten Bewegungsmerkmalen des beobachteten Objekts variiert.

Die Implementierung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit einer Vorrichtung gemäß Fig. 1 erfolgt derart, daß das Objekt 11 auf dem Monitor 17 vergrößert dargestellt und das Detektormittel zur Erfassung eines Teilbereichs des Objekts auf dem Bildschirm installiert wird. Bei geeigneter Ansteuerung der Mikroanordnung setzt sich das Objekt 11 in Rotation. Durch den Vorbeitritt des Objekts an dem vom Detektormittel erfaßten Teilbereich werden aufgrund von Kontrastschwankungen auf der Objektoberfläche Helligkeitsunterschiede erfaßt. Dementsprechend zeigen die elektrischen Detektorsignale eine Zeitabhängigkeit, die charakteristisch für die Zeitabhängigkeit der periodischen Objektbewegung ist. Die Detektorsignale werden digitalisiert, gegebenenfalls zwischengespeichert und einer Auswertungsanalyse unterzogen. Die Auswertungsanalyse umfaßt eine Fourier-Analyse und/oder eine Autokorrelationsanalyse.

Fig. 2 zeigt zwei Abbildungen einer mikroskopisch vergrößerten Zelle 21 mit erfindungsgemäß angebrachten Photoelementen 22, 23 und 24 des Detektormittels. Gemäß der oberen Abbildung (A) sind zwei Meßphotoelemente 22, 23 angebracht, die jeweils ein Teilbereich der Zelle 21 erfassen. Das Referenz-Photoelement 24 ist neben dem Zellbild angebracht und dient der Erfassung

des Hintergrundrauschens. Zeigt das abgebildete Objekt wie die Zelle 21 nur geringe Strukturen (kleine Helligkeitsunterschiede, geringer Kontrast bzw. geringe Brechungsunterschiede) so wird erfindungsgemäß eine Bildkontrastierung vorgenommen. Die Bildkontrastierung kann auf optischem Weg durch Veränderung der Objektbeleuchtung am Mikroskop oder auf elektronischem Weg durch eine Signalkontrastierung nach elektronischer Videosignalbearbeitung erzielt werden.

Alternativ zur vergrößerten Abbildung des zu beobachtenden Objekts bei Beleuchtung im Auflicht gemäß Fig. 2 kann erfindungsgemäß die Erfassung der Objektbewegung durch Detektion der Autofluoreszenz (Eigenfluoreszenz) des Objekts erfolgen. Hierzu wird das Objekt im Feldkäfig mit Anregungslicht geeigneter Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. Die Detektion erfolgt durch einen geeigneten Filter zur Abtrennung des Anregungslichts. Da die Fluoreszenzeigenschaften (insbesondere Fluoreszenzintensität) sensibel auf Strukturänderungen reagieren, besitzen die meisten untersuchten Objekte mit geeigneten Strukturen (insbesondere biologische Zellen oder Zellbestandteile) eine über die Objektabbildung verteilt inhomogene Fluoreszenz, so daß durch Erfassung eines Teilbilds des mikroskopisch vergrößerten Objekts Helligkeitsunterschiede erfaßt werden können, deren Periodizität der Zeitabhängigkeit der Objektbewegung entspricht. Diese Verfahrensweise besitzt den besonderen Vorteil, daß die zu untersuchenden Objekte keiner Vorbehandlung, insbesondere keiner Fluoreszenzmarkierung durch Einfärbung, unterzogen werden müssen.

Das untere Bild (B) von Fig. 2 zeigt die Wirkung einer elektronischen Signalkontrastierung an der Zelle 21 gemäß Bild A. Es ist erkennbar, daß die Helligkeitsunterschiede auf dem Objektabbild vergrößert und somit größere Detektorsignalamplituden erzielbar sind. Die Signalkontrastierung kann auch im Falle einer Fluoreszenzmessung vorgesehen sein.

In den Figuren 3, 4, 5 und 7 sind erfindungsgemäß gewonnene Detektorsignale und ihre Bearbeitung dargestellt. Dabei zeigen jeweils die Kurvenverläufe a die Zeitabhängigkeit des Detektorsignals (Spannungs- oder Stromverlauf eines Photoelement-signals), b die Fourier-Transformierte (Amplitude in Abhängigkeit von der Zeit) des Detektorsignals gemäß a und c die Autokorrelationsfunktion (relative Einheiten in Abhängigkeit von der Zeit des Detektorsignals gemäß a).

Fig. 3 illustriert die Messung an einem gut kontrastierten Objekt (künstlicher dielektrischer Körper). Die tatsächliche Rotationsgeschwindigkeit lag bei 2 U/s. Das Detektorsignal a unterliegt periodischen Schwankungen, die der Objektrotation entsprechen. Die Fourier-Transformierte b liefert eine maximale Amplitude bei der Rotationsfrequenz und geringere Beiträge bei den höheren Harmonischen (4 bzw. 6 Hz). Die Autokorrelationsfunktion c, die eine Faltung des Detektorsignals a mit sich selbst unter Einbeziehung einer vorbestimmten Verzögerungszeit darstellt, besitzt entsprechende Maxima bei den Vielfachen der Periodendauer. Die Signalanalysen b bzw. c liefern Werte für die Periodendauer von $T = 0.502$ s bzw. $T = 0.501$ s. Die Abweichung liegt somit unterhalb von 2% in Bezug auf den erwarteten Wert 0.5 s. Diese hohe Genauigkeit der Bewegungserfassung stellt einen entscheidenden Vorteil dar.

Die Figuren 4 und 5 zeigen entsprechende Messungen an einem Lymphozyten (Durchmesser 15 μm) bzw. einem Pollenkorn von *Corylus Avellana*.

Es ist erfindungsgemäß möglich, ausschließlich die Fourier-Analyse oder ausschließlich die Autokorrelations-Analyse durchzuführen. Zur Erhöhung der Meßgenauigkeit wird jedoch eine Kombination von beiden analytischen Verfahren bevorzugt.

Falls das Detektormittel mehrere Photoelemente umfaßt, die jeweils einen anderen Teilbereich des beobachteten Objekts aufnehmen, kann zusätzlich zur Erfassung der Periodendauer

auch die Bewegungsrichtung ermittelt werden. Hierzu werden eine erste und eine zweite Autokorrelations-Analyse entsprechend für die ersten und zweiten Photoelemente durchgeführt und die Phasenverschiebung zwischen den Autokorrelations-signalen erfaßt. Das Photoelement mit dem voranlaufenden Autokorrelationssignal liegt dabei in Bewegungsrichtung vor dem anderen Photoelement.

Wie in Bezug auf die Rotation beschrieben, kann analog die Periodendauer und Auslenkung bei translatorischen Oszillationen erfaßt werden.

Fig. 6 zeigt ein Beispiel einer automatischen Spektrenerfassung (durchgezogene Linie 61) im Vergleich mit einer diskreten, visuellen Beobachtung (gepunktete Linie 62) mit einer Stoppuhr-Zeitmessung. Das Rotationsspektrum einer lebenden Zelle (Rotation = $\text{Im}(f_{cm})$ = Imaginärteil des Clausius-Moscotti-Faktors s als Funktion des Logarithmus der Feldfrequenz zeigt die Anwendbarkeit der Erfindung über einen weiten Frequenzbereich und eine gute Übereinstimmung der visuellen Beobachtung.

Fig. 7 illustriert eine weitere Messung an einem künstlichen dielektrischen Körper. Das Detektorsignal a wurde mit einem Photoelement auf der Monitorfläche erfaßt. Das Objekt wurde mit einer im Vergleich zu Fig. 3 wesentlich höheren Geschwindigkeit gedreht. Die tatsächliche Rotationsgeschwindigkeit lag bei rd. 12.8 U/s, was einer Bewegungsperiode von T von rd. 0.07825 s entspricht. Das Signal des Photoelements wurde während einer Meßzeit von 20 s mit einer Meßfrequenz von 171 Messungen/s aufgenommen. Die Fourier-Transformierte b ergibt eine Periodendauer $T_{FFT} = 0.078245$ s, was einem relativen Fehler gegenüber der tatsächlichen Drehgeschwindigkeit unterhalb von 0.01% entspricht. Dem Spektrenverlauf b ist ferner die Bildwiederholfrequenz des Monitors (60 Hz) erkennbar.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung beruht in der Kombinierbarkeit der Bewegungserfassung mit anderen Autokorrelationsmessungen. So besteht eine bevorzugte Verwendung der Erfindung in der Kombination mit optischen Autokorrelationsmessungen, insbesondere mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS). Hierzu zählen beispielsweise FCS-Meßanordnungen mit einer confokal angeordneten Lochblende (WO 94/16313), mit einer laserinduzierten Zwei-Photonen-FCS (EP-A 0 762 114, US-A-5 034 613) oder mit einer nahfeld-mikroskopischen Anordnung, mit der stoffspezifische Parameter eines oder mehrerer Moleküle mittels Korrelationsspektroskopie ermittelt werden (WO 96/13744).

Die Erfindung kann jedoch mit Vorteil auch bei beliebigen anderen confokalen Meßanordnungen angewendet werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bewegungserfassung eines Mikroobjekts (11), das sich zumindest zeitweilig periodisch in einem Mikrofeldkäfig einer Mikroelektrodenanordnung (12) bewegt, wobei mit einem Mikroskop eine vergrößerte Abbildung des Objekts auf mindestens ein Detektormittel (18) derart erfolgt, daß das Detektormittel einen Teilbereich des Objekts erfaßt, und wobei ein Detektorsignal des Detektormittels über den Zeitraum einer Mehrzahl von Bewegungsperioden des Objekts aufgenommen und einer Fourier-Analyse und/oder einer Korrelationsanalyse unterzogen wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zur Objektabbildung das zu beobachtende Objekt mit einem optischen System auf das Detektormittel abgebildet wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem die Abbildung derart erfolgt, daß das Detektormittel einen Teilbereich des Objekts erfaßt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, bei dem der Teilbereich weniger als 50% der abgebildeten Objektoberfläche umfaßt.
5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Objektabbildung unter Verwendung eines Mikroskops, eines Videosystems und eines Anzeigemonitors erfolgt, wobei das Detektormittel mindestens ein Photoelement umfaßt, das auf der Bildschirmfläche des Monitors in einem Teilbereich des abgebildeten Objekts angebracht wird.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem mindestens zwei Photoelemente mit Abstand im Bereich des abgebildeten Objekts vorgesehen sind und die Phasenverschiebung zwischen den Korrelationssignalen erfaßt wird, die aus den Detektorsignalen der Photoelemente ermittelt sind.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem zur Objektabbildung ein Teilbereich des Objekts auf ein Detektormittel abgebildet wird, das im Strahlengang eines Mikroskops vorgesehen ist.

8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die beobachteten Objekte suspendierte Mikropartikel in elektrischen Hochfrequenz-Feldkäfigen sind.

9. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem simultan zur Bewegungserfassung eine korrelationsspektroskopische Messung erfolgt.

10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem zur Objektabbildung das Objekt im Mikrofeldkäfig mit Anregungslicht bestrahlt wird und das Detektormittel zur Erfassung der Eigenfluoreszenz des Objekts eingerichtet ist.

11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Objekt durch eine biologische Zelle oder Zellbestandteile oder durch einen dielektrischen Körper gebildet wird.

12. Vorrichtung zur Bewegungserfassung eines Mikroobjekts (11) in einem Mikrofeldkäfig einer Mikroelektrodenanordnung (12), mit einem Mikroskop (13) zur Erzeugung einer Objektabbildung, Detektormitteln (18) zur Erfassung eines Teilbereichs des Objekts und Signalbearbeitungs- und Rechenmitteln zur Bearbeitung der Signale der Detektormittel mit einer Fourier-Analyse und/oder einer Korrelationsanalyse.

13. Vorrichtung gemäß Anspruch 12, bei der als Abbildungsmittel ein Lichtmikroskop, ein Videosystem und ein Monitor vorgesehen sind, auf dessen Bildschirmfläche das Detektormittel angebracht ist, das aus mindestens einem Photoelement besteht.
14. Vorrichtung gemäß Anspruch 12, bei dem als Abbildungsmittel ein Lichtmikroskop vorgesehen ist, in dessen Strahlengang das Detektormittel angebracht ist.
15. Vorrichtung gemäß Anspruch 13 oder 14, bei dem das Detektormittel dazu eingerichtet ist, einen Teilbereich des Objektes zu erfassen und ein Detektorsignal bereitzustellen, dessen Zeitabhängigkeit charakteristisch für die Zeitabhängigkeit der Objektbewegung ist.
16. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 15, die eine Mikroelektrodenanordnung enthält, die zur Manipulierung mikroskopischer kleiner Objekte unter Wirkung von Hochfrequenzfeldern und zur optisch-mikroskopischen Beobachtung eingerichtet ist.
17. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 16, die eine Meßanordnung zur Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie enthält.

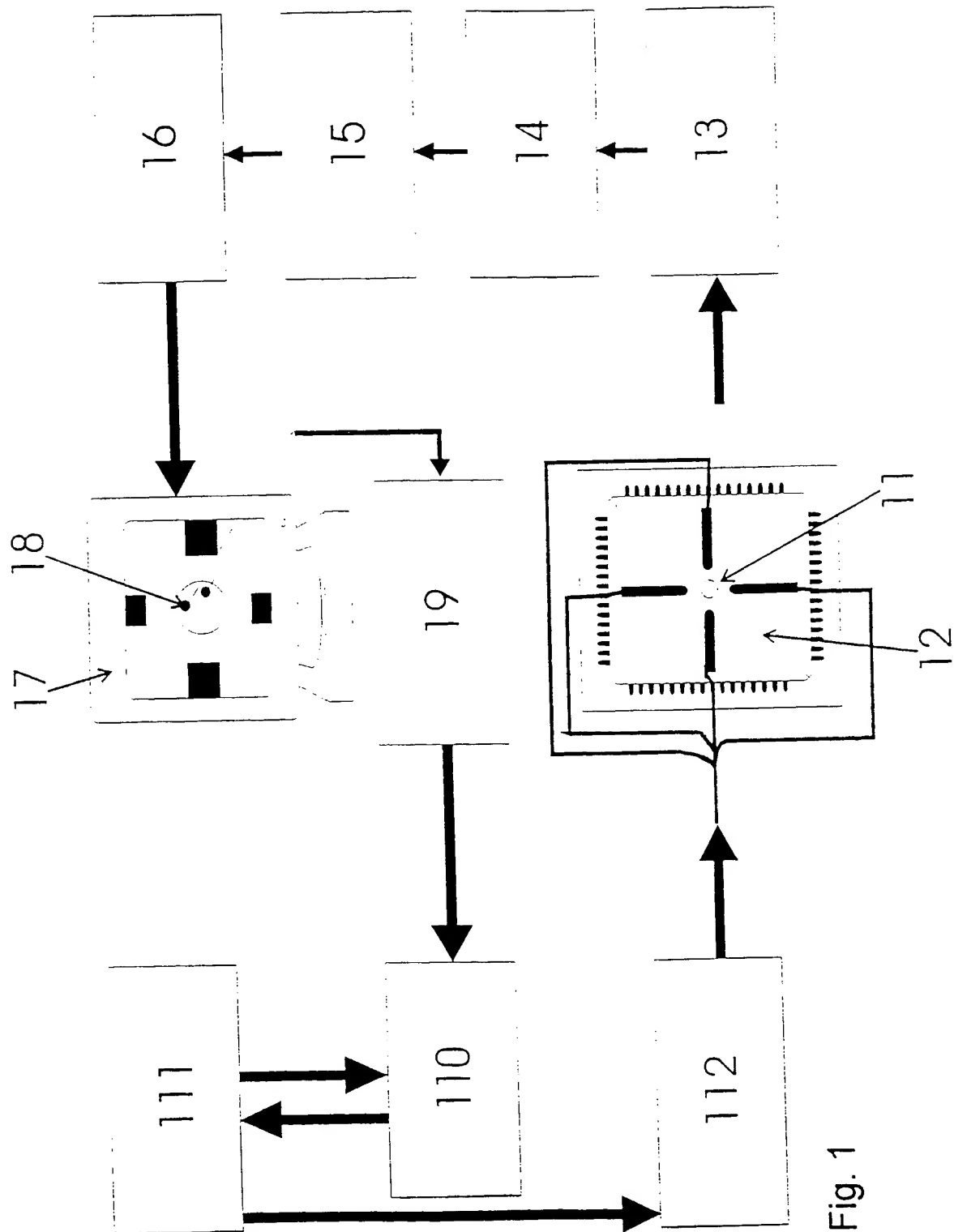


Fig. 1

2/7

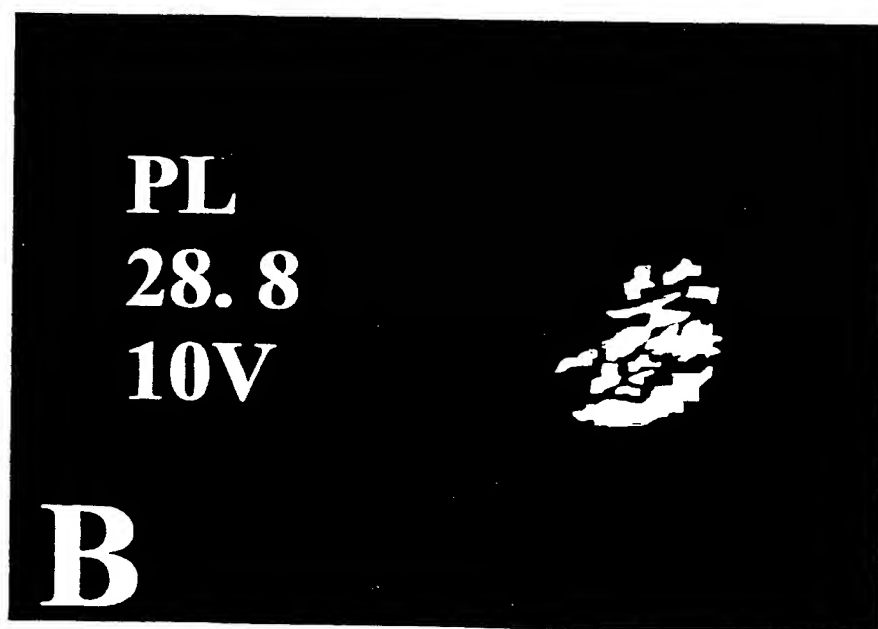
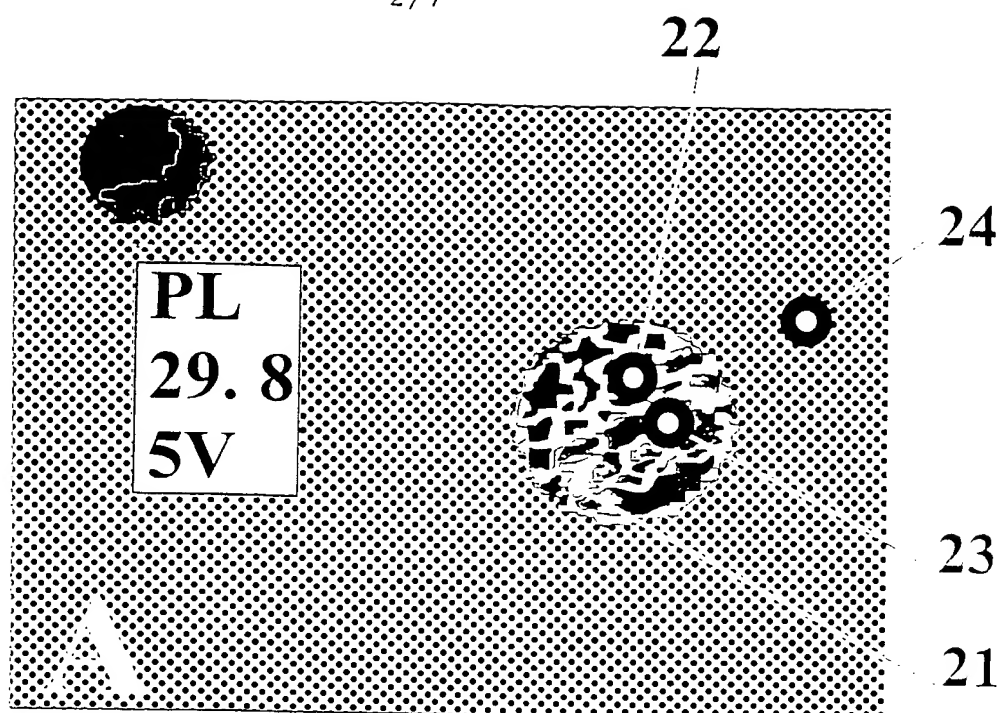
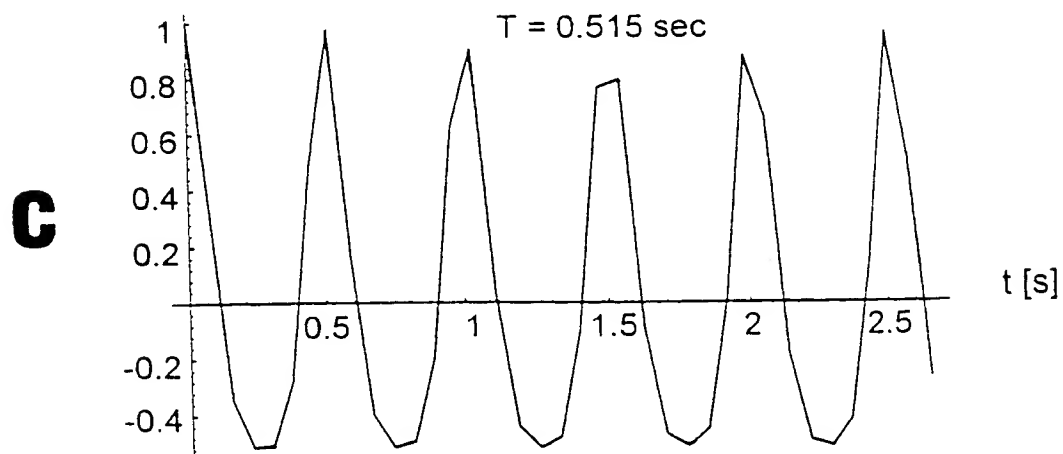
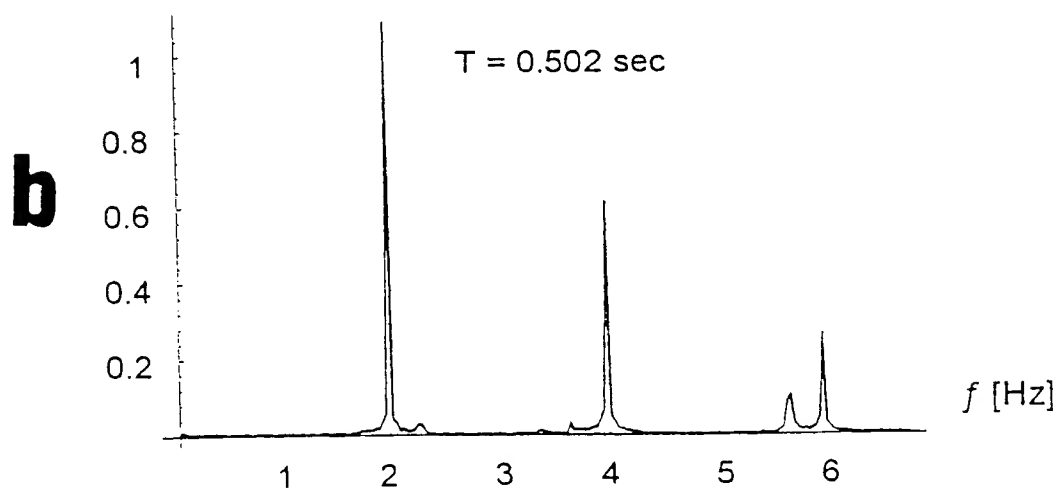
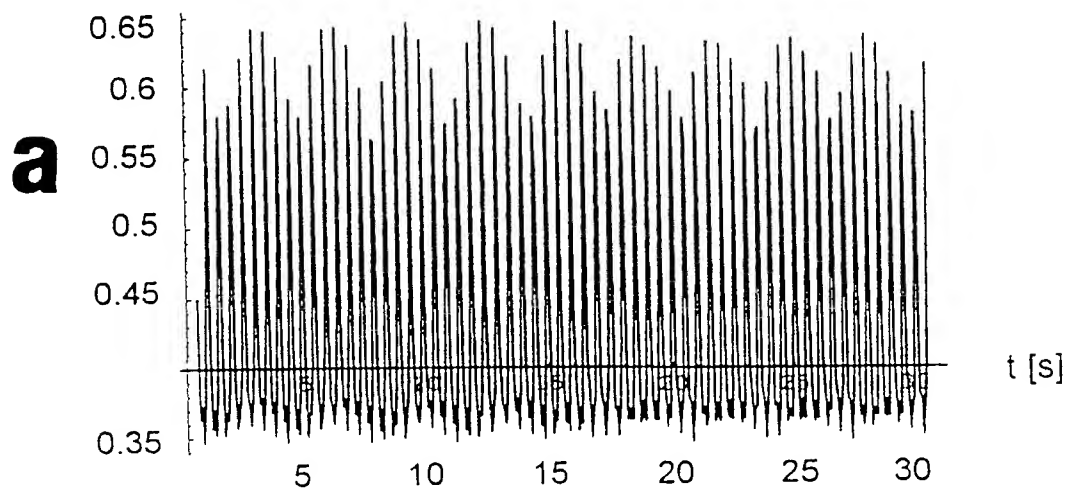


Fig. 2

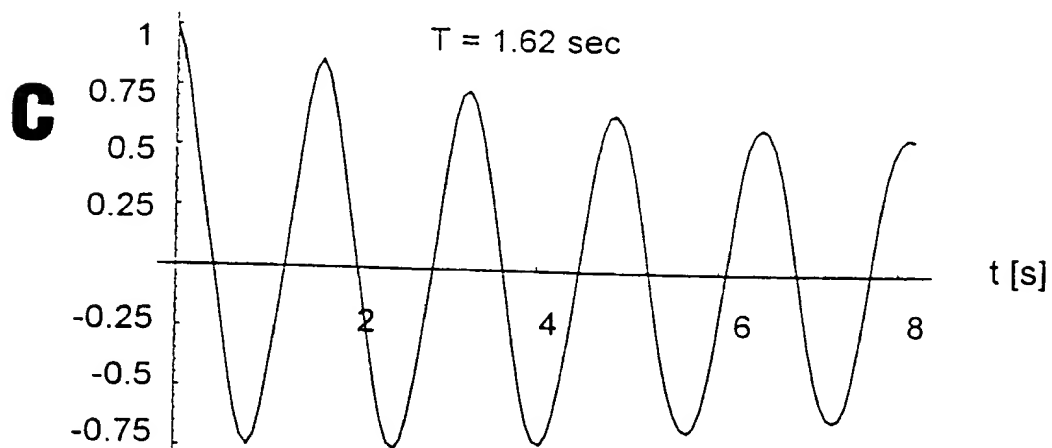
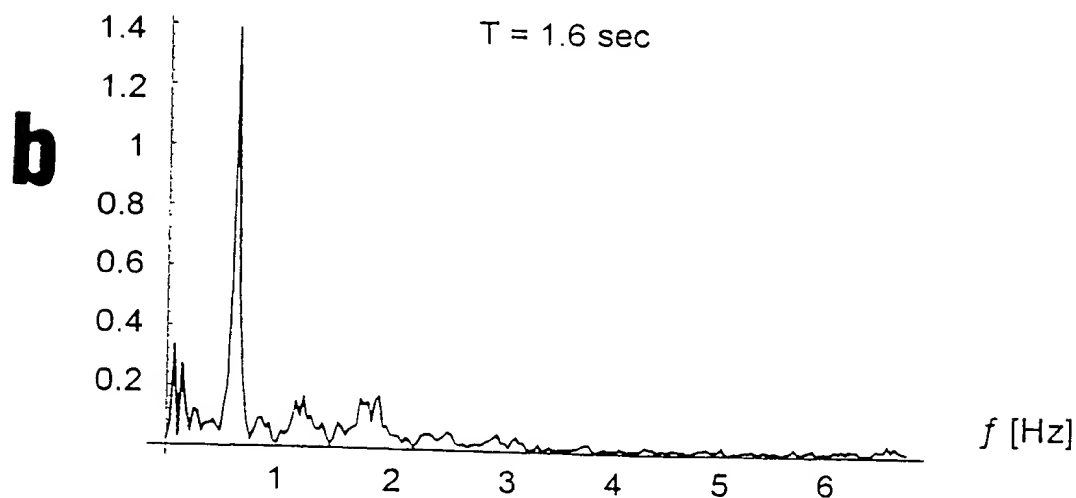
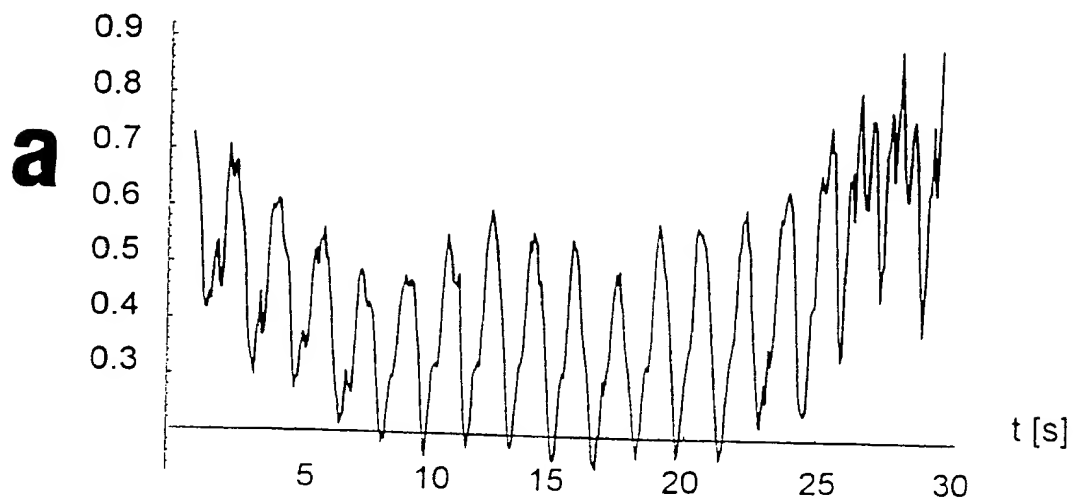
3/7

Fig. 3



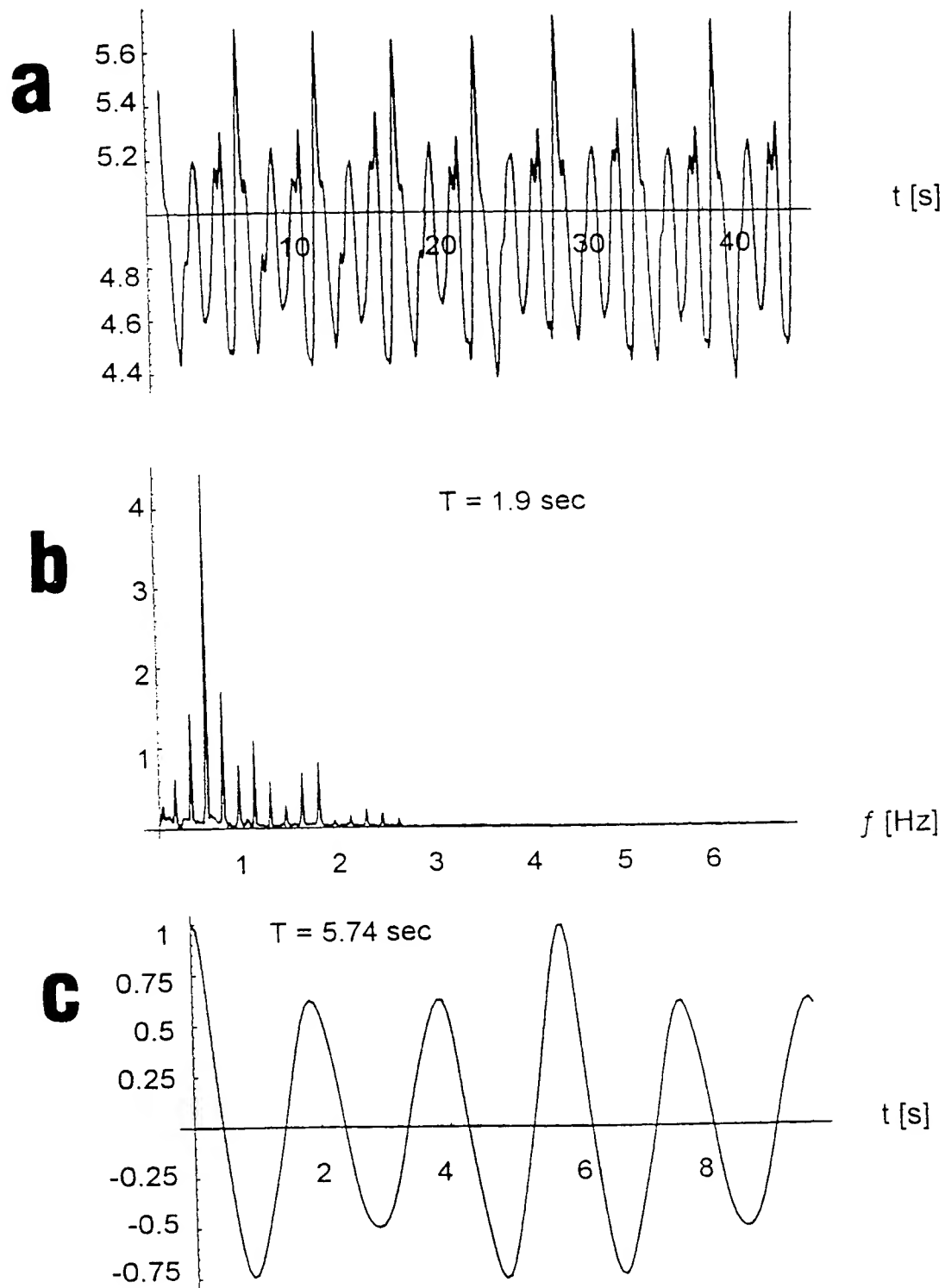
4/7

Fig. 4



5/7

Fig. 5



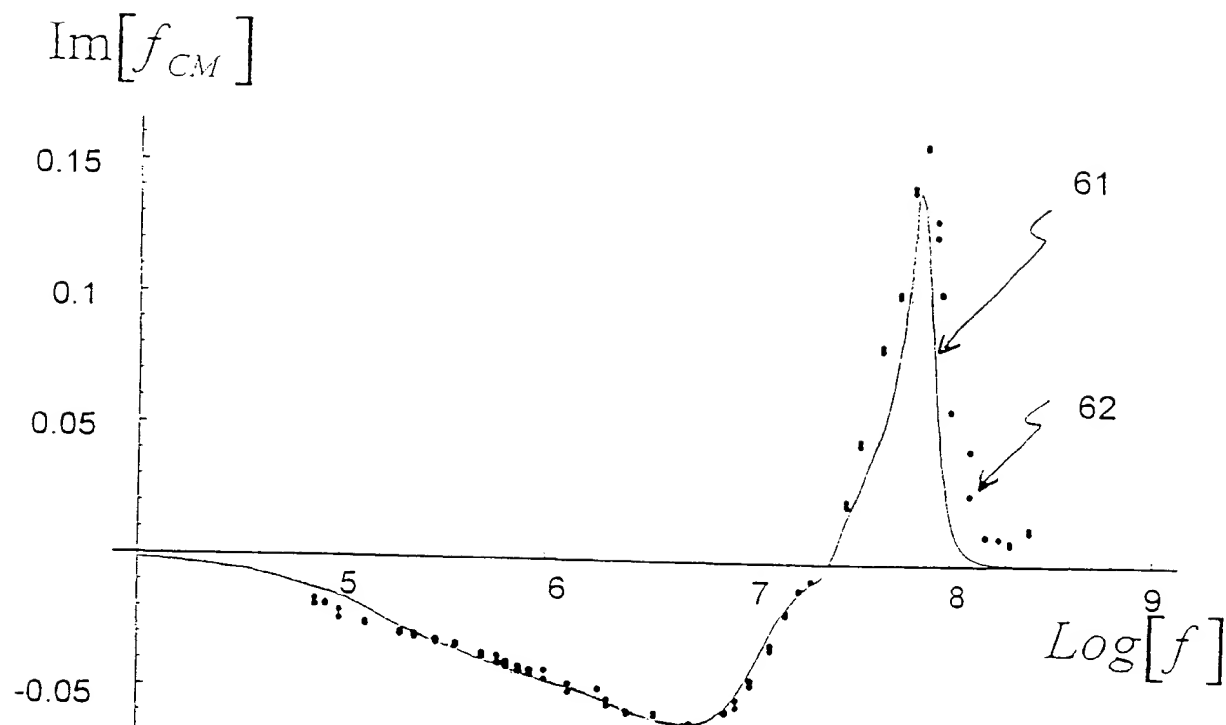
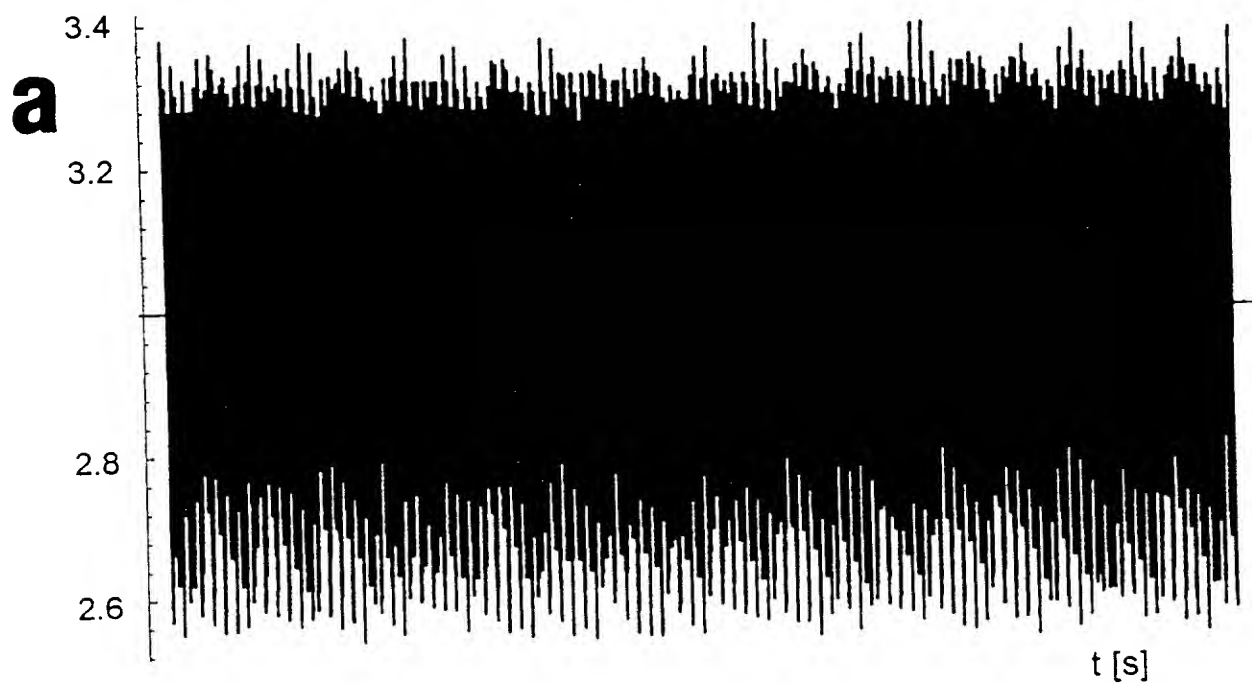


Fig. 6

7/7



Max at {12.7804, 4.66027} $T = 0.0782451$ sec

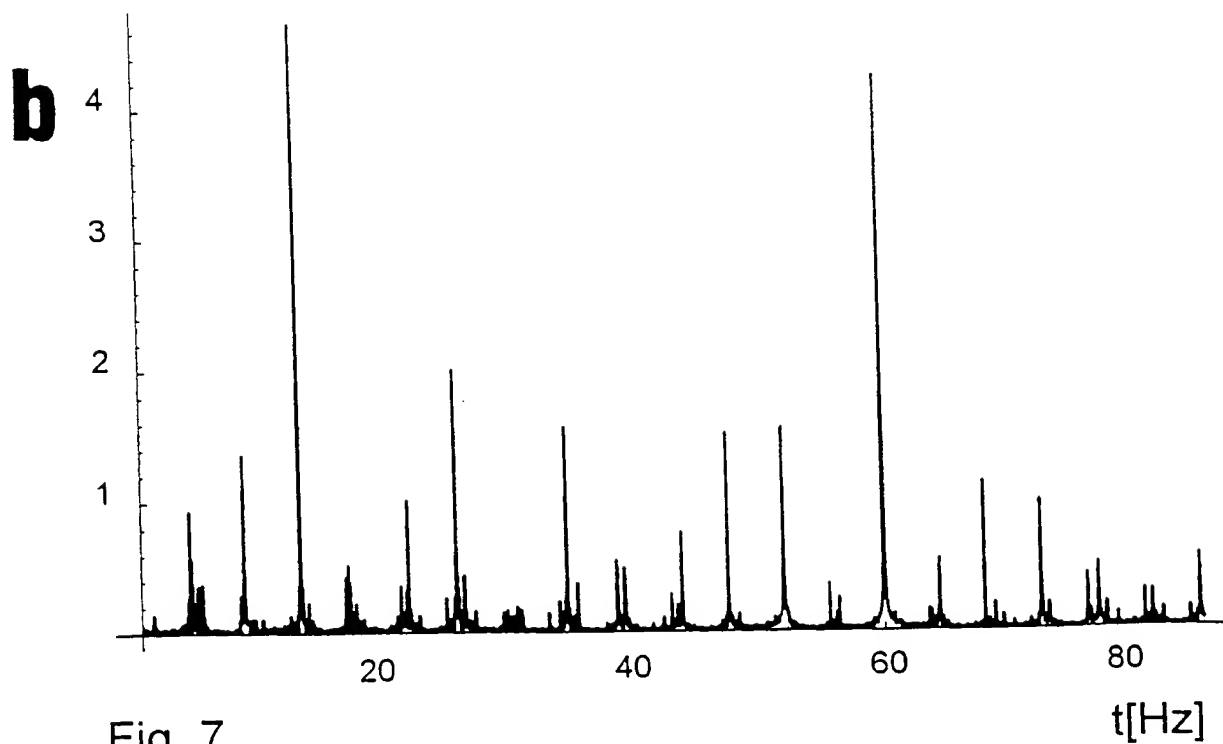


Fig. 7

ERSATZBLATT (REGEL 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/07218

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N15/14 C12M1/34 G01P3/80

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N G01P C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 93 16383 A (SCIENT GENERICS) 19 August 1993 see page 1, line 1-5	1-3, 12, 14-17
A	see page 8, line 4-35 see page P11, line 19-29 see page 12, line 11 - page 13, line 28 ---	4-11, 13
Y	US 3 942 022 A (STUMPF KENNETH D ET AL) 2 March 1976 see column 1, line 11-19 see column 1, line 50 - column 2, line 6 ---	1-3, 12, 14-17 4-11, 13
A	US 5 229 849 A (PLEASS C M ET AL) 20 July 1993 see column 5, line 34-48 ---	1
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex.

" Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 June 1998

Date of mailing of the international search report

16/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/07218

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 94 08244 A (RISØE FORSKNINGSCENTER ;HANSON STEEN GRUENER (DK)) 14 April 1994 see page 1, line 5-11 see page 6, line 5-16 see page 7, line 19-35 see page 11, line 10 - page 12, line 5 see page 15, line 31 - page 16, line 30 -----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/07218

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9316383	A	19-08-1993	AU 3459193 A CA 2129729 A EP 0625267 A JP 7506898 T NZ 246927 A	03-09-1993 09-08-1993 23-11-1994 27-07-1995 27-08-1996
US 3942022	A	02-03-1976	NONE	
US 5229849	A	20-07-1993	US 5108907 A AU 3432093 A WO 9314599 A AU 593531 B AU 4736985 A CA 1277851 A DE 3586307 A EP 0179270 A JP 61228360 A	28-04-1992 03-08-1993 22-07-1993 15-02-1990 27-03-1986 18-12-1990 13-08-1992 30-04-1986 11-10-1986
WO 9408244	A	14-04-1994	DE 69309956 D DE 69309956 T EP 0671007 A US 5636014 A	22-05-1997 24-07-1997 13-09-1995 03-06-1997

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

In ... ales Aktenzeichen

PCT/EP 97/07218

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 G01N15/14 C12M1/34 G01P3/80

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N G01P C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
Y	WO 93 16383 A (SCIENT GENERICS) 19. August 1993 siehe Seite 1, Zeile 1-5	1-3, 12, 14-17
A	siehe Seite 8, Zeile 4-35 siehe Seite P11, Zeile 19-29 siehe Seite 12, Zeile 11 - Seite 13, Zeile 28	4-11, 13
Y	US 3 942 022 A (STUMPF KENNETH D ET AL) 2. März 1976	1-3, 12, 14-17
A	siehe Spalte 1, Zeile 11-19 siehe Spalte 1, Zeile 50 - Spalte 2, Zeile 6	4-11, 13
A	US 5 229 849 A (PLEASS C M ET AL) 20. Juli 1993 siehe Spalte 5, Zeile 34-48	1
	--- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Juni 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/06/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
A	WO 94 08244 A (RISØE FORSKNINGSCENTER ;HANSON STEEN GRUENER (DK)) 14.April 1994 siehe Seite 1, Zeile 5-11 siehe Seite 6, Zeile 5-16 siehe Seite 7, Zeile 19-35 siehe Seite 11, Zeile 10 - Seite 12, Zeile 5 siehe Seite 15, Zeile 31 - Seite 16, Zeile 30 -----	1

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Patentnummer des Aktenzeichens

PCT/EP 97/07218

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9316383 A	19-08-1993	AU 3459193 A	03-09-1993
		CA 2129729 A	09-08-1993
		EP 0625267 A	23-11-1994
		JP 7506898 T	27-07-1995
		NZ 246927 A	27-08-1996
US 3942022 A	02-03-1976	KEINE	
US 5229849 A	20-07-1993	US 5108907 A	28-04-1992
		AU 3432093 A	03-08-1993
		WO 9314599 A	22-07-1993
		AU 593531 B	15-02-1990
		AU 4736985 A	27-03-1986
		CA 1277851 A	18-12-1990
		DE 3586307 A	13-08-1992
		EP 0179270 A	30-04-1986
		JP 61228360 A	11-10-1986
WO 9408244 A	14-04-1994	DE 69309956 D	22-05-1997
		DE 69309956 T	24-07-1997
		EP 0671007 A	13-09-1995
		US 5636014 A	03-06-1997

